第 42 卷 第 2 期　　昆 虫 学 报　　Vol.42，No.2
1999 年 5 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　May，1999

溴氰菊酯对不同品系家蝇脑突触体膜蛋白磷酸化及 ATP 酶活性的影响*

田　雨　冷欣夫

（中国科学院动物研究所，北京　100080）

摘要　以敏感品系家蝇和溴氰菊酯抗性品系家蝇（*Musca domestica* L.）为材料，研究和比较了神经毒剂溴氰菊酯对其脑突触体蛋白磷酸化作用的影响。结果表明，浓度为 10^{-5} mol/L 溴氰菊酯抑制了敏感品系家蝇脑突触体蛋白磷酸化作用，而对抗性品系家蝇脑突触体蛋白磷酸化作用无明显影响。若反应体系中加入 2.5×10^{-6} mol/L 的 cAMP 显著激活了敏感品系家蝇脑突触体蛋白磷酸化水平，但是当 0.6 mmol/L Ca^{2+} 或 0.6 mmol/L Ca^{2+} 加 10^{-5} mol/L 钙调蛋白时明显增强了抗性品系家蝇脑突触体蛋白磷酸化水平，甚至超过了其对敏感品系的作用水平。此外，还发现不同浓度的溴氰菊酯可抑制突触膜上的 Na/K-ATP 酶和 Ca-ATP 酶活力，浓度越高抑制作用也越大，并且敏感品系家蝇对溴氰菊酯的敏感度要高于抗性品系。

关键词　溴氰菊酯，家蝇脑突触膜，蛋白磷酸化，Na/K-ATP 酶，Ca-ATP 酶，家蝇 S 品系和溴氰菊酯 R 品系

蛋白质磷酸化和去磷酸化调节着几乎每一个生命过程。尤其在细胞受到外界信号刺激应答时可逆的蛋白磷酸化作用是其重要的作用机制。如在神经系统中，神经递质，激素和神经冲动传导到细胞表面产生的生物反应，是由于在靶细胞内第二信使（如 cAMP，cGMP，Ca^{2+} 和肌醇多磷酸酯）浓度的增加[1]。第二信使是通过特异性的 cAMP，cGMP 和依赖 Ca^{2+} 的蛋白激酶的活化产生影响。当蛋白激酶将 PO_4^{3+} 基从 ATP 分子转移到丝氨酸，苏氨酸和酪氨酸的 OH 基上，由于构型上的变化，其功能（如神经递质的合成与释放，神经兴奋等）也产生了改变[2]。

溴氰菊酯能影响家蝇脑突触体内源性蛋白质磷酸化，即总体磷酸化水平。并抑制了分子量为 33 kD 的 3 个蛋白，等电点 pI 在酸性端，其磷酸化反应受 cAMP 依赖的蛋白激酶催化[3]。Matsumura（1986，1988）[4,5]指出 DDT 和拟除虫菊酯影响蛋白磷酸化，尤其 Ca^{2+} 在蛋白磷酸化过程中也起重要调控作用。溴氰菊酯不仅影响脑突触体膜蛋白磷酸化作用，而且已有实验证明了溴氰菊酯在浓度为 10^{-7} mol/L 与 10^{-3} mol/L 之间抑制家蝇和大鼠脑突触膜 Na/K-ATP酶和 Mg-ATP 酶活力，并发现哺乳动物对溴氰菊酯要比昆虫敏感[3]。

本文研究溴氰菊酯，cAMP，Ca^{2+} 和钙调蛋白（Calmoduline，CaM）对敏感和溴氰菊酯抗性品系家蝇脑突触体膜蛋白磷酸化的作用，及溴氰菊酯对不同品系家蝇的靶标酶系（ATP

*　国家自然科学基金资助项目（39270117）
1997-10-09 收稿，1998-05-18 收修改稿

酶）的作用实质。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

IR-Deltamethrin（含量99%）由法国Roussel Uclaf公司赠送；Tris，EDTA，甲叉丙烯酰胺，BSA由SIGMA化学公司产品；Ficoll-400购于Phamacia Inc. 公司；ATP（Adenosine triphosphate）由British Drug House LTD. 出品；丙烯酰胺，SDS，Ourbain为E Merck，Darm Stadt公司产品；巯基乙醇，考马斯亮兰G-250购于Fluka Chemical Co. 公司；过硫酸铵由Bio-Rad公司出品；TEMED是Koch-Light公司产品；钙调蛋白购于北京师范大学生物系；γ-^{32}P-ATP放射比活度为>5 000 Ci/mmol，放化纯度为95%，由北京亚辉生物医学工程公司提供；其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 实验材料

以敏感品系和抗溴氰菊酯品系家蝇（*Musca domestica* L.）为对象，均于实验室饲养，喂以红糖、奶粉和清水，室内恒温25℃。抗溴氰菊酯品系家蝇每两个月用0.1%的溴氰菊酯处理1次，实验时用羽化后第4天的成蝇作材料。

1.3 仪器设备

BECKMAN低速离心机GS-6KR型；高速离心机JZ-MC型；HITACHI超速离心机CP-70型；Flexi-Dry™冷冻干燥仪FTS型；BIO-RAD电泳仪3000Xi型及垂直板电泳，IEF电泳和电洗脱装置；BECKMAN DU-650型紫外分光光度计。

1.4 抗性倍数的测定

以不同浓度的溴氰菊酯丙酮液对抗溴氰菊酯品系家蝇（以R表示）和敏感品系家蝇（以S表示）分别进行中胸背板点滴，点滴量为每头1 μL。共设5组，每组25头雌蝇，24 h后观察每组死亡个数并计算死亡率，求出LD_{50}，同时得到R对S的抗性倍数。

1.5 Na/K-ATPase和Ca-ATPase活性测定

依据Muszbek等（1977）[6]和冯北元等（1981）[7]的方法，本文略有改动。即将不同浓度的溴氰菊酯（1 μL）加入反应体系同突触膜样品一起保温5 min之后再进行反应。家蝇脑突触体膜样品的制备采用肖丹青（1994）[8]的方法。蛋白质的测定方法采用Bradford（1976）[9]的微量测定法。

1.6 蛋白质磷酸化反应

参考罗远等（1991）[10]的方法。反应总体积80 μL，其中含有30 mmol/L Tris-HCl缓冲液pH 7.6；10 mmol/L $MgCl_2$，100 μg蛋白质含量的突触体膜样品，实验组分别含有10^{-5} mol/L溴氰菊酯，2.5×10^{-6} mol/L cAMP，0.6 mmol/L Ca^{2+}或0.6 mmol/L Ca^{2+}加10^{-5} mol/L钙调蛋白，在37℃水浴中保温2 min，迅速加入25 μm［γ-^{32}P］ATP（10^3～

10^4 cpm/nmol)进行磷酸化反应 1 min，然后用 600 μL 冰冷的丙酮终止反应，之后离心2 min，弃去上清液，将沉淀溶于 50 μL 电泳缓冲液中。

1.7　放射性自显影

将上述磷酸化样品进行垂直板电泳，分离胶浓度为 10%，浓缩胶为 4%，电泳条件 200 V，80 mA，历时 50 min，并加标准蛋白作为分子量标记一同电泳，干燥后的凝胶直接进行放射性自显影在 −20℃ 冰箱中曝光一周左右，磷酸化蛋白由 ^{32}P 在 X 光片上曝光的条带所显示（用 D196 显影液及酸性定影液冲洗 X 光片）。

1.8　分离目的蛋白及等电点的测定

在经放射性自显影的 X 光片上有一条分子量为 48 kD 的蛋白带，用电洗脱方法分离这个蛋白质，电极液为 Tris-HCl 缓冲液 pH 8.3，1% SDS，洗脱条件为恒流 10 mA/杯，时间为 6 h。收集含有蛋白的洗脱液，放入处理后的透析袋中，透析 3 天（透析袋的处理方法：2%（w/v）$NaHCO_3$，1 mmol/L EDTA，煮沸 15 min，冷却后反复用清水冲洗）用冷冻干燥法浓缩蛋白，经垂直板电泳检测蛋白分子量后，进行 IEF 电泳，4% Ampholine pH 3～10，电泳条件 100 V，15 min；200 V，15 min；450 V，60 min。

2　结果

2.1　家蝇的抗性倍数

溴氰菊酯对室内饲养敏感和抗性品系家蝇种群的抗性倍数为 1 118.289 倍。

表 1　溴氰菊酯对家蝇成虫毒力测定结果

Table 1　Toxicity of deltamethrin to housefly (♀)

种群	试虫（头/组）	LD_{50}（μg/雌）	$Y = a + bX$	LD_{95}（μg/雌）	R/S
delta.-R 品系	25	10.065	$4.143 + 0.855X$	84.508	
S 品系	25	0.009	$2.938 + 2.165X$	0.052	1 118.289

注：所选家蝇为羽化后第 4 天的雌蝇

2.2　S、R 品系家蝇脑突触体膜蛋白磷酸化的比较

家蝇脑突触膜与 ^{32}P-ATP 一起保温，经 SDS-PAGE 与放射性自显影后的 X 光片上出现了 6 条被标记的蛋白，分子量分别是 58，53，48，43，29 和 26 kD（图 1）。这 6 条蛋白磷酸化反应水平在 S 品系都要高于 R 品系。10^{-5}mol/L 溴氰菊酯明显抑制了 S 品系的蛋白磷酸化作用，而反应体系加入 2.5×10^{-6}mol/L cAMP 时 S 品系的磷酸化水平增强，尤其对 58，53，48，43 kD 的激活作用明显。但其对 R 品系磷酸化的刺激作用只有在 48，43kD 这两条蛋白带上有微弱体现。情况不同的是，在 0.6 mmol/L Ca^{2+} 或 0.6 mmol/L Ca^{2+} 加 10^{-5}mol/L 钙调蛋白参入体系中时，他们对 R 品系蛋白磷酸化的激活作用远远大于对 S 品系的作用，6 条蛋白带都表现得很明显，尤其是 29，26 kD 两条蛋白带表现更强。

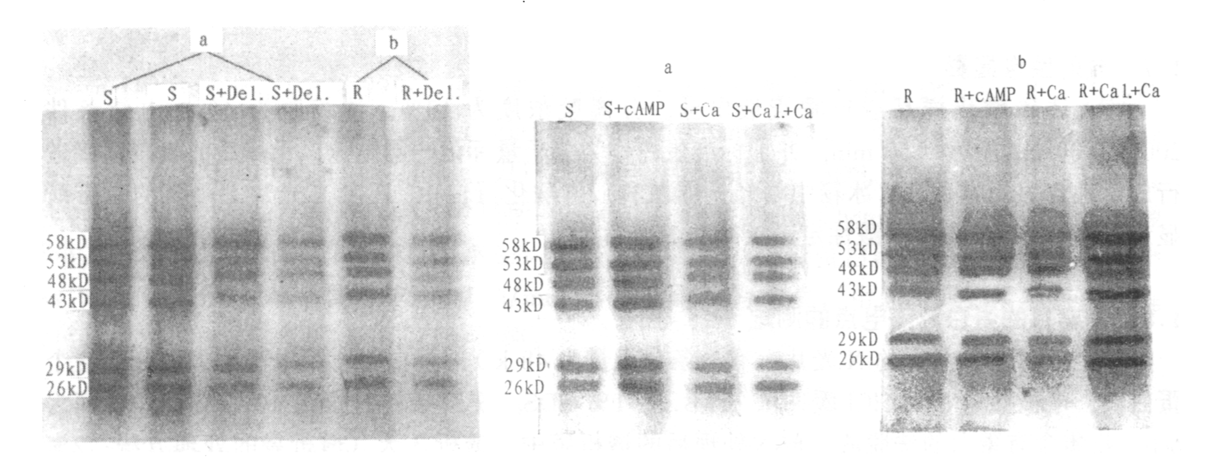


图1 溴氰菊酯对家蝇脑突触膜蛋白磷酸化作用影响的SDS-PAGE图谱

Fig.1 SDS-PAGE pattern of the effect of deltamethrin on protein phosphorylation of SPM from housefly brain

a：敏感品系（Susceptible strain）；b：溴氰菊酯抗性品系（Deltamethrin resistant strain）

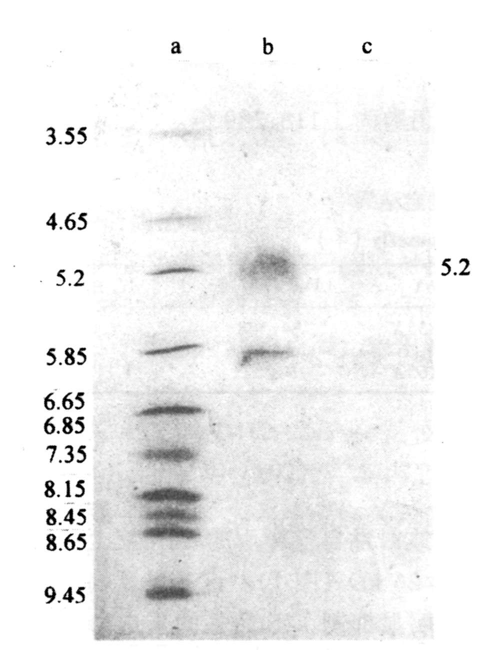


图2 等电聚焦电泳测定纯化蛋白等电点的图谱

Fig.2 IEF pattern of the pI of purified 48 kD protein

a：标准等电点蛋白（Standard pI proteins）；
b：敏感品系（Susceptible strain）；
c：溴氰菊酯抗性品系（Deltamethrin resistant strain）

2.3 分子量为48 kD蛋白的纯化

在R品系中48 kD蛋白的磷酸化反应依赖于Ca^{2+}和CaM，而不依赖于cAMP。但是，在S品系中48 kD蛋白的磷酸化反应依赖于Ca^{2+}和CaM，也依赖于cAMP。将此蛋白用电洗脱分离纯化之后，进行等电聚焦（IEF）电泳，在等电点的标准曲线上确定此蛋白的等电点是5.2（图2）。依据其特性推测有可能是B-50蛋白[11]。

2.4 S、R品系家蝇脑突触膜Na/K-ATP酶和Ca-ATP酶活性分析

通过测定S和R品系家蝇脑突触膜Na/K-ATP酶活性结果表明，S品系的酶活要高于R品系的1.2倍。实验中加入不同浓度的溴氰菊酯（10^{-8} mol/L～10^{-4} mol/L），则其对S品系酶活的抑制强于对R品系，即S品系家蝇的Na/K-ATP酶对溴氰菊酯敏感程度要高于R品系。如溴氰菊酯的浓度为10^{-4}mol/L时，S品系家蝇的Na/K-ATP酶活性抑制率为35%，而R品系家蝇的活性抑制率为21%（图3）。

溴氰菊酯对 Ca-ATP 酶活性也有抑制作用。在浓度为 10^{-9} mol/L～10^{-4} mol/L 时，抑制程度也呈线性关系。当溴氰菊酯的浓度为 10^{-4} mol/L 时，对 S 品系家蝇的 Ca-ATP 酶活性抑制率为 24.3%，对 R 品系的抑制率为 17.5%（图 4）。

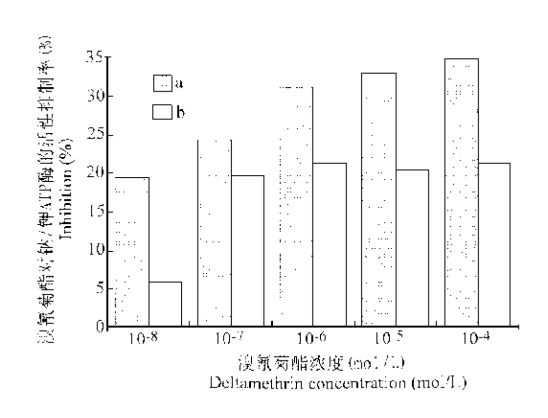


图 3　溴氰菊酯对 S 和 R 品系家蝇脑突触膜 Na/K-ATP 酶活性影响（重复 6 次）

Fig. 3　Percentage of inhibition of Na/K-ATPase activity by deltamethrin

a：敏感品系（Susceptible strain）；

b：溴氰菊酯抗性品系（Deltamethrin resistant strain）

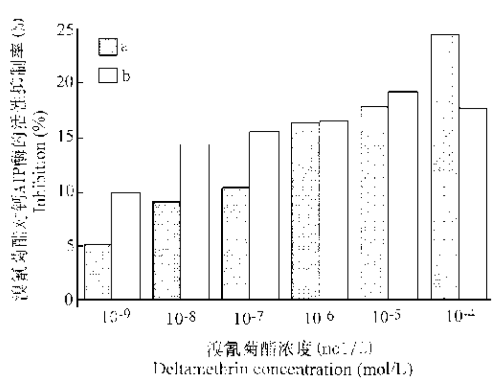


图 4　溴氰菊酯对 S 和 R 品系家蝇脑突触膜 Ca-ATP 酶活性影响（重复 3 次）

Fig. 4　Percentage of inhibition of Na/K-ATPase activity by deltamethrin

a：敏感品系（Susceptible strain）；

b：溴氰菊酯抗性品系（Deltamethrin resistant strain）

将 S 和 R 品系家蝇的 ATP 酶活性进行总体水平比较可以看出，S 品系的 ATP 酶活高于 R 品系。这说明 R 品系家蝇在长期受到溴氰菊酯作用的情况下，ATP 酶的活性已有所下降。

3　讨论

在蛋白质磷酸化的可逆反应中是由蛋白激酶和蛋白磷酸化酶分别催化磷酸化和去磷酸化可逆过程。磷酸化的“增强”或“减弱”即表明 ^{32}P-磷酸基团对某个蛋白的掺入量的增多或减少，这可以由改变蛋白激酶及蛋白磷酸酯酶的活性两种途径实现。

在 S、R 品系家蝇脑突触体膜实验中，10^{-5}mol/L 溴氰菊酯抑制 S 和 R 品系总的蛋白磷酸化水平，在两个品系中，对 R 品系磷酸化的抑制要低于 S 品系。同时 S 品系蛋白磷酸化明显受到 cAMP 的刺激，已知 cAMP 通过依赖 cAMP 的蛋白激酶而起作用，特别是对 48 kD 蛋白质磷酸化的刺激更为明显。蛋白激酶有两个调节亚基（分子量 49～55 kD）和两个催化亚基（分子量 40 kD）组成，通常当 cAMP 不存在时，两个调节亚基通过两个巯基结合在两个不活化的催化亚基上，每个调节亚基有两个 cAMP 结合位点。当与 cAMP 结合，催化亚基从全酶上解离下来并有了催化活性。情况不同的是 cAMP 对 R 品系家蝇蛋白磷酸化无明显激活作用。这可能是 R 品系家蝇长期受到溴氰菊酯的作用，使得依赖 cAMP 的蛋白激酶调节中的活性受到影响所致。

反应体系中加入 Ca^{2+} 和 CaM 时，R 品系家蝇蛋白质磷酸化受到的激活作用明显高于 S

品系。这与 Charalambous 和 Matsumura（1992）[1]以 S 和 R 品系蜚蠊和家蝇为材料所做的实验结果并不一致。这也表明在 CaM 存在时，抗性品系的家蝇的依赖 Ca^{2+} 和 CaM 的蛋白激酶（CCPK）的行为与敏感品系是不相同的。

钙调蛋白有调节 Ca^{2+} 运输到受体、离子通道和酶等多种重要功能。特别在神经系统中，钙调蛋白在钙的调节作用中起着重要的作用。而膜表面上的 Ca^{2+} 可能受到 Ca^{2+}-ATP 酶的控制，游离的细胞内的 Ca^{2+} 由内流及外出的平衡所决定，并通过与 Ca^{2+} 结合钙调蛋白的相互作用达到平衡。钠泵是依赖于膜上的 ATP 酶的调控。本文实验结果表明，IR-溴氰菊酯能抑制家蝇脑突触体膜 Na/K-ATP 酶和 Ca-ATP 酶的活性，但不同品系家蝇受抑制情况不同，如对 S-品系家蝇 Na/K-ATP 酶和 Ca-ATP 酶的活性抑制率（%）均高于 R-品系。已知 ATP 酶的催化亚基存在多种同功形式，并有可能不同的亚基形式对激素或其它效应分子及离子浓度的反应不同[12]，因此在不同家蝇品系中 Na/K-ATP 酶和 Ca-ATP 酶的亚基形式和功能有所不同，或者是由于 R-品系 Na/K-ATP 酶和 Ca-ATP 酶的活力敏感性降低所致，尚需进一步研究。

参 考 文 献 （References）

1 Charalambous P，Matsumura F. Difference in the property of the nerve calmodulin-dependent protein kinase between *KDR*-type，pyrethriod-resistant and susceptible strains of *Musca domestica* and *Blattella germanica*. Insect Biochem. Molec. Biol.，1992，22（7）：721～734

2 Browning M D，Huganir R，Greengard P. Protein phosphorylation and neuronal function. J. Neurochem.，1985，45：11～23

3 Leng Xin-Fu，Xiao Dan-Qing. Effect of deltamethrin on protein phosphorylation of housefly brain synaptosomes. Pesticide Science，1995，44：88～89

4 Matsumura F. On inhibitory action of DDT and pyrethriods on ATP-utilizing，calcium transporting system in the neuronal tissues. In：Membrane Receptors and Enzymes as Targets of Insecticide Action，New York.：Plenum Press. 1986，173～178

5 Matsumura F. Deltamethrin induced changes in choline transport and phosphorylation activities in synaptosomes from the optic lobe of squid. Comp. Biochem. Physiol.，1988，89：179～183

6 Muszbek L，Szabq T，Fesus L. A highly sensitive method for the measuremant of ATPase activity. Anal. Biochem.，1977，77：286～288

7 冯北元，徐慕愚. 大鼠脑突触体 Na/K-ATPase 活力的微量测定方法. 生物化学与生物物理进展，1981，2：48～49

8 肖丹青，冷欣夫. 不连续 Ficoll 密度梯度法分离家蝇脑突触体. 昆虫知识，1994，31（2）：101～103

9 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.，1976，72：248～254

10 罗 远，姜建成，冷欣夫. 溴氰菊酯对鼠肝细胞蛋白质磷酸化的影响. 动物学集刊，1991，8：9～11

11 Enan E，Matsumura F. Stimulation of protein phosphorylation in intact rat brain synaptosomes by pyrethriod insecticide，deltamethrin. Pestic. Sci.，1991，4：513～520

12 Lingeral J B. Na/K-ATPase：Isoform structure，function and expression. J. Bioenergetics and Biomembrances，1990，24（3）：263～270

INHIBITION OF PROTEIN PHOSPHORYLATION AND ATPase ACTIVITY BY DELTAMETHRIN IN HOUSEFLY BRAIN SYNAPTOSOMES

Tian Yu　　Leng Xinfu

（Institute of Zoology，Academia Sinica，Beijing　100080）

Abstract　Deltamethrin was found to affect ATPase activity and protein phosphorylation of housefly brain synaptosome *in vitro*. Both Na，K-ATPase and Ca-ATPase activities can be inhibited by various concentrations of deltamethrin（10^{-9}～10^{-4}mol/L）. However，the inhibition was higher in susceptible housefly than in deltamethrin resistant strain. In intact susceptible housefly brain synaptosome the most significant result was inhibition of endogenous protein phosphorylation by 10^{-5}mol/L of deltamethrin. Such effect in deltamethrin resistant housefly was suppressed by adding the exogenous Ca^{2+} or Ca^{2+} and calmodolin to the reaction system. Cyclic AMP stimulated the overall phosphorylation level，particularly 48 kD protein in susceptible housefly. The 48 kD protein，isoelectric point pI 5.2，may be the brain-specific B-50 protein in housefly. All these results indicated that：（1）Deltamethrin has the property to affect ATPase activity and protein phosphorylation.（2）Deltamethrin might limits calcium transport which connects with the protein phosphorylation.

Key words　deltamethrin，synaptosome of housefly brain，protein phosphorylation，Na/K-ATPase，Ca-ATPase，deltamethrin-resistant and susceptible strains of *Musca domestica*